

تأثیر اسانس گیاه سیر، مانکوزب و متالاکسیل - مانکوزب روی سه گونه قارچ فیتوفتورا، عوامل بوته‌میری گیاهان

۱. وحید فرهنگ؛ ۲. جهانشیر امینی*؛ ۳. تیمور جوادی

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان

۲. دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان

۳. استادیار گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۲/۱۶ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۴/۲۰)

چکیده

در این تحقیق تأثیرات ضد قارچی اسانس گیاه سیر و دو قارچ‌کش متالاکسیل - مانکوزب و مانکوزب علیه سه گونه *Phytophthora capsici*، *P. drechsleri* و *P. melonis* عوامل بوته‌میری گیاهان فلفل، خیار و طالبی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه ارزیابی شد. تأثیر اسانس سیر و قارچ‌کش‌ها روی کاهش رشد پرگنه قارچ بیمارگر به روش اختلاط با محیط کشت محاسبه و میزان EC_{50} اسانس سیر روی گونه‌های فیتوفتورا نیز اندازه‌گیری شد. شناسایی ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس سیر نیز با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی با طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) انجام شد. نتایج آزمایشگاهی نشان داد که اسانس سیر خاصیت قارچ‌ایستایی و تأثیر چشمگیری روی کاهش رشد پرگنه گونه‌های فیتوفتورا دارد. بیشترین و کمترین میزان بازدارندگی رشد ناشی از اسانس سیر به ترتیب متعلق به *P. capsici* و *P. drechsleri* بود. نتایج گلخانه‌ای هم نشان داد که اسانس سیر به‌طور چشمگیری باعث کاهش شدت بیماری بوته‌میری (۷۳/۷-۸۱/۵ درصد) در مقایسه با شاهد شد، به طوری که، تأثیرات آن از لحاظ آماری بیشتر از قارچ‌کش مانکوزب (۶۰/۵-۶۸/۴ درصد) و کمتر از قارچ‌کش متالاکسیل - مانکوزب (۸۴/۲-۹۲/۱ درصد) روی کاهش بیماری بود. تعداد ۲۵ ترکیب شیمیایی از اسانس سیر جداسازی و شناسایی شد که در بین آن‌ها Diallyl tetra sulfide (۳۱/۳۲ درصد)، Allyl disulfide (۲۶/۷۸ درصد)، Nitrosothymol (۸/۶۴ درصد)، 1H-1,2,4-Triazole, 3-thiol-5-methyl (۸/۴۰ درصد) و Allylsulphide (۶/۱۵ درصد) به ترتیب بیشترین مقادیر را به خود اختصاص دادند. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که اسانس سیر توانایی لازم برای کنترل بیماری بوته‌میری گیاهان را به‌عنوان قارچ‌کش در تولید محصولات ارگانیک دارد و نیاز است که تحقیقات بیشتری درباره آن انجام شود.

کلیدواژگان: اسانس سیر، بوته‌میری، فیتوفتورا، مانکوزب، متالاکسیل - مانکوزب.

مقدمه

نقش بسیار حیاتی در زندگی مردم از نظر غذایی دارد و بخشی از صادرات غیر نفتی کشور را تشکیل می‌دهد.

تولید محصولات کشاورزی به‌خصوص سبزی و صیفی

بی‌ضرر بودن آن‌ها برای محیط زیست اشاره کرد (Yaouba *et al.* 2010). این ترکیبات پتانسیل بالایی برای استفاده در برنامه کنترل تلفیقی آفات دارند (Amini *et al.* 2012) و با توجه به مشکلات موجود در مورد کاربرد قارچ‌کش‌ها، مطالعه و تحقیق در خصوص روش‌های جدید و مطمئن و کم‌هزینه برای کنترل و مدیریت بیماری‌های گیاهی یک ضرورت است (Marandi *et al.* 2011).

یکی از گیاهانی که اثر وسیع میکروبی‌کشی دارد و به دلیل خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی آن، مصرف فراوان دارد، گیاه سیر (*Allium sativum* L.) است (Martinez *et al.* 2007). خواص ضد قارچی و ضد باکتریایی گیاه سیر بارها توسط محققان ثابت شده است و این گیاه واجد ترکیبات سولفوره و سایر ترکیبات فنولیکی است (Belew *et al.* 2009).

هدف از اجرای این تحقیق بررسی تأثیرات ضد قارچی اسانس سیر و دو قارچ‌کش مانکوزب و متالاکسیل - مانکوزب برای کنترل بیماری بوته‌میری گیاهان سبزی و جالیزی ناشی از شبه قارچ فیتوفتوراست.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های قارچی بیمارگر

در بهار و تابستان سال‌های ۱۳۹۲-۱۳۹۱، نمونه‌برداری از مزارع صیفی و جالیز، خیار، فلفل، طالبی و گوجه‌فرنگی، مشکوک به آلودگی انجام شد؛ بافت طوقه و ریشه گیاهان آلوده پس از ضدعفونی سطحی با محلول کلراکس ۱۰ درصد و شست‌وشو با آب مقطر سترون روی محیط‌های کشت (PDA) Potato Dextrose Agar و Corn meal Agar- PARPH کشت شد. جدایه‌های قارچ به روش تک هیف خالص‌سازی و در دمای یخچال روی محیط کشت PDA نگهداری شدند. شناسایی جدایه‌های قارچ با استفاده از مشخصات مرفولوژیکی اندام‌های قارچ انجام شد (Ershad 1992; Stamps *et al.* 1990).

آزمون بیماری‌زایی

آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ با روش Tabarraei *et al.* (2011) انجام شد. بدین صورت بذور گیاهان فلفل

این محصولات دائماً در معرض میکروارگانسیم‌های بیمارگر اطراف خود هستند که در این بین، قارچ‌های بیمارگر گیاهی سبب خسارات بسیاری در مزارع سبزی و صیفی در سرتاسر دنیا می‌شوند (Bajpai and Kang 2012; Etebarian 2012). میزان خسارت محصولات کشاورزی ناشی از بیماری‌های قارچی حدود ۱۲ درصد از تولید جهانی است که این مقدار در کشورهای توسعه‌نیافته بیشتر است (D'Mello *et al.* 1998; Serra 2008; Sitara *et al.* 2006). یکی از این بیماری‌های مخرب که هر سال خسارت چشمگیری به محصولات سبزی و صیفی‌جات در مزارع و گلخانه‌ها وارد می‌کند، بیماری مرگ گیاهچه و بوته‌میری ناشی از شبه قارچ فیتوفتوراست (Etebarian, 2012). مدیریت این بیماری مبتنی بر اعمال روش‌های زراعی و شیمیایی است. کنترل شیمیایی عوامل بیماری‌زای قارچی و مصرف بیش از حد قارچ‌کش‌ها در مدیریت بیماری‌های گیاهان، به‌خصوص بیماری‌های خاکزاد سبب عوارضی همچون اختلال در گرده‌افشانی، سرطان‌های ناشی از باقیمانده سموم روی مواد غذایی، آلودگی‌های زیست‌محیطی و پدیده مقاومت در مقابل قارچ‌کش‌ها شده است (Zhang *et al.* 2009; Khan *et al.* 2011; Bajpai *et al.* 2008; Bi *et al.* 2012; Sarpeleh *et al.* 2009).

استفاده از اسانس‌ها و عصاره گیاهی و متابولیت‌های ثانویه آن‌ها به‌عنوان یکی از روش‌های نوین کنترل بیماری‌های گیاهی، مطرح و بیشتر در سطوح آزمایشگاهی انجام شده است (Sacchetti *et al.* 2005; Sokovic and Griensven, 2006). این مواد، ترکیبات پیچیده‌ای دارند که به‌عنوان مواد بیولوژیک سمی هستند و علیه آفات و قارچ‌های بیمارگر گیاهی به‌کار می‌روند (Rasooli *et al.* 2002)؛ بنابراین، با توجه به نقش محافظتی این ترکیبات، شناسایی و بررسی آن‌ها می‌تواند نقش مؤثری در کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی داشته باشد (Cowan 1999). با افزایش آگاهی درباره اهمیت کاربرد اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی در کشاورزی و صنایع دارویی، جداسازی و استفاده از اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی رو به افزایش است (Amvam zollo *et al.* 1998) از دلایل این امر می‌توان به داشتن منشأ طبیعی و نبودن باقیمانده‌های سمی و

بررسی تأثیر اسانس گیاه سیر و قارچ کش مانکوزب و متالاکسیل - مانکوزب روی شبه قارچ فیتوفتورا به روش اختلاط با محیط کشت

در این تحقیق علاوه بر تأثیر اسانس سیر از قارچ کش‌های مانکوزب (پودر وتابل ۸۰ درصد) و متالاکسیل - مانکوزب (پودر وتابل ۷۸ درصد) نیز در ۶ غلظت بر حسب ppm روی شبه قارچ فیتوفتورا استفاده شد.

به منظور تعیین درصد بازدارندگی اسانس گیاه سیر، اسانس سیر به روش اختلاط با محیط کشت در غلظت‌های مختلف بر حسب ppm (۱۵، ۳۱، ۴۷، ۶۳، ۷۹، ۹۵) طبق آزمون Pre-test ارزیابی شد. غلظت‌های مختلف اسانس سیر به سورفکتانت (Tween 80) به نسبت حجمی ۰/۵ درصد (v/v) در ۵ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه شد. پس از خروج محیط کشت سترون از اتوکلاو زمانی که دمای آن حدود ۴۰ درجه سلسیوس رسید، غلظت‌های مختلف اسانس سیر تهیه شده به محیط کشت مربوطه اضافه شد. در پتری‌های شاهد به جای اسانس فقط از آب مقطر سترون حاوی (Tween 80) به نسبت حجمی ۰/۵ درصد استفاده شد (Oxenham et al. 2005). سپس، درون هر تشتک پتری ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی اسانس توزیع شد. بعد از انعقاد محیط‌های کشت، با چوب‌پنبه سوراخ‌کن قرص‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر از حاشیه پرگنه فعال ۷ روزه قارچ جدا و در وسط تشتک‌های محیط کشت حاوی اسانس سیر قرار داده شدند. برای این آزمون چهار تکرار در نظر گرفته شد. (Zhang et al. 2009). به منظور ارزیابی درصد بازدارندگی اسانس سیر روی رشد قارچ و مقایسه رشد آن با شاهد در فواصل زمانی معین (۲ روز یکبار) نحوه رشد پرگنه قارچ بازبینی و قطر آن با خط‌کش اندازه‌گیری شد. سرانجام با استفاده از فرمول زیر درصد بازدارندگی برای هر غلظت محاسبه شد.

$$\text{Mycelial Growth Inhibition (MFI)\%} = \frac{dC - dT}{dC} \times 100$$

C: میانگین قطر کلنی قارچ بر حسب میلی‌متر در شاهد
T: میانگین قطر کلنی قارچ بر حسب میلی‌متر در تیمار
مورد نظر

(رقم Dimaz)، طالبی (رقم سمسوری) و خیار (رقم Pepino) پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۲ دقیقه در داخل گلدان‌های حاوی خاک استریل (شن، رس، خاک برگ) کشت شدند. گلدان‌ها در گلخانه‌ای در دمای ۲۶-۲۲ درجه سلسیوس، رطوبت ۷۰-۶۰ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. در مرحله ۳-۴ برگی گیاهچه‌ها، خاک کنار طوقه و ریشه، کنار زده شد و چهار قطعه ۰/۵ سانتی‌متری از محیط کشت حاوی پرگنه جدایه‌های شبه قارچ فیتوفتورا در کنار طوقه و ریشه گیاهچه‌ها قرار داده شد و دوباره خاک پای بوته‌ها به حالت اول برگردانده شد. در تیمار شاهد فقط از محیط کشت خالص بدون قارچ استفاده شد. ارزیابی بیماری یک ماه بعد انجام شد (Tabarraei et al. 2011).

تهیه اسانس سیر و شناسایی ترکیبات آن

اسانس سیر از شرکت زردبند تهران تهیه شد. برای شناسایی ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس سیر از دستگاه کروماتوگرافی گازی همراه با طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) دانشکده علوم پایه دانشگاه کردستان استفاده شد. دستگاه گاز کروماتوگرافی استفاده شده از نوع Agilent 7890 A با ستون به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر از نوع HP-5MS بود. برنامه دمایی ستون به این نحو تنظیم شد: دمای ابتدایی آن ۵۰ درجه سلسیوس و توقف در این دما به مدت ۵ دقیقه، گرادیان حرارتی ۳ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه، افزایش دما تا ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۵ درجه سلسیوس در هر دقیقه، افزایش دما تا ۳۰۰ درجه سلسیوس و ۳ دقیقه توقف در این دما، دمای اتاقت تزریق ۲۹۰ درجه سلسیوس بود و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان (فلو) ۰/۸ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده شد. طیف‌نگار جرمی مورد استفاده مدل Agilent 5975 C با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای منبع یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سلسیوس بود. شناسایی ترکیب‌های اسانس سیر با استفاده از شاخص بازداری و بررسی طیف‌های جرمی و مقایسه با طیف‌های جرمی پیشنهادی توسط کتابخانه‌های کامپیوتر دستگاه کروماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی انجام شد.

روی کوتیلدون، ۳= افتادگی برگ‌های گیاه و زردی و پژمردگی قسمت‌های هوایی گیاه بجز برگ‌های جوان، ۴= آلودگی، افتادگی و پژمردگی کل قسمت‌های هوایی گیاه، ۵= مرگ و خشکیدگی کامل گیاه (Shouan Zhang et al. 2010).

همه آزمایش‌ها در چهار تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌های به‌دست‌آمده، با نرم‌افزار SPSS انجام شد و آنالیز واریانس با (ANOVA) و مقایسه میانگین براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan) در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتیجه و بحث

شناسایی گونه‌های قارچ فیتوفتورا و بیماری‌زایی آن‌ها کشت و بررسی نمونه‌های جدا شده از مزارع آلوده صیفی و سبزی مشخص کرد جدایه‌های قارچ بیمارگر متعلق به گونه‌های *Phytophthora capsici*، *P. drechsleri* و *P. melonis* هستند. نتایج بیماری‌زایی این قارچ‌ها به ترتیب روی گیاهان فلفل، خیار و طالبی مثبت و هر سه گونه قارچ باعث بوته‌میری، زردی و مرگ گیاهان شدند. مجدد از اندام‌های ریشه و طوقه گیاهان بیمار، قارچ بیمارگر جداسازی شدند. شناسایی جدایه‌های قارچ براساس مرفولوژی اندام‌های قارچ از قبیل فرم کلنی، میسیلیوم، اسپورانژیوفور، اسپورانژ، اندام‌های جنسی نر و ماده و غیره و براساس منابع معتبر به شرح زیر شناسایی شدند (Ershad 1992, Stamps et al. 1990).

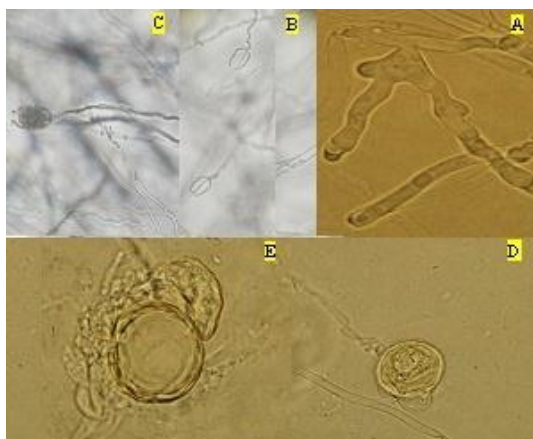
Phytophthora capsici دارای هیف‌های صاف و بدون دیواره و رشد نسبتاً سریع است. هیف‌ها یکنواخت و با زاویه حاده و قائمه منشعب می‌شوند و دارای عرض بین ۳-۸ میکرومترند. اسپورانژیوفورها باریک در برخی مواقع کمی در پایه عریض‌تر، منشعب و نامنظم هستند و اسپورانژها در انتهای آن‌ها تشکیل می‌شوند. اسپورانژیوم‌ها بیشتر نامنظم، کروی تا تخم‌مرغی شکل به طول ۴۵-۷۵ میکرومتر، اغلب کج و خمیده با بیش از یک رأس و پستانک‌دارند. اووسپورها کروی دارای دیواره نازک و بیرنگ و به قطر ۴۲-۱۵ میکرومتر هستند (شکل ۱).

جالیز دارای هیف‌های یکنواخت و گره‌دار و زاویه

به‌منظور مشخص کردن اثر قارچ‌کشی یا قارچ‌ایستایی اسانس مورد استفاده، قرص‌هایی از کلنی قارچ با قطر ۰/۵ سانتی‌متر برداشته شد که روی محیط کشت حاوی اسانس هیچ‌گونه رشدی نداشته است و روی محیط کشت CMA بدون اسانس منتقل و ۷ روز در دمای ۲۶±۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از ۷ روز، رشد قارچ مورد نظر نشانگر اثر قارچ‌ایستایی و رشد نکردن قارچ نشانگر اثر قارچ‌کشی اسانس مورد نظر بود (Soylu et al. 2006, Siripornvisal et al. 2009).

همچنین، ارزیابی EC_{50} (Median Effective Concentration) اسانس سیر روی گونه‌های مختلف قارچ فیتوفتورا از روی داده‌های بازدارندگی محاسبه شد. EC_{50} از طریق رگرسیون پروبیت خطی روی نمودار (محور افقی لگاریتم غلظت‌ها و محور عمودی پروبیت بازدارندگی) با نرم‌افزار SPSS ver. 18 انجام شد (Feen and Coffey 1984).

بررسی تأثیر اسانس سیر و قارچ‌کش‌های شیمیایی روی بیماری بوته‌میری صیفی و جالیز در شرایط گلخانه در این روش بذور گیاهان فلفل، خیار و طالبی پس از ضدعفونی و کاشت در خاک گلدان‌ها، در مرحله ۴-۳ برگی مطابق روش اثبات بیماری‌زایی که قبلاً توضیح داده شد به ترتیب با مایه قارچ بیمارگر *P. capsici*، *P. drechsleri* و *P. melonis* تلقیح شدند. بعد از ۲۴ ساعت ۵۰ میلی‌لیتر از اسانس گیاه سیر و قارچ‌کش‌های مذکور با غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام به خاک اطراف ریشه گیاهچه‌های آلوده به قارچ بیمارگر اضافه شد. اضافه کردن عصاره و قارچ‌کش‌ها تا حدی بود که از زیر گلدان‌ها آبی خارج نشود. در تیمار شاهد به‌جای اسانس گیاه سیر از آب مقطر سترون به اضافه سورفکتانت (Tween 80) استفاده شد. برای هر تیمار چهار تکرار در نظر گرفته شد. گلدان‌ها در شرایط گلخانه تحت درجه حرارت ۲۷±۵ درجه سلسیوس نگهداری و هر دو روز یک‌بار آبیاری شدند. اندازه‌گیری شدت بیماری براساس نمره ۵-۰ به شرح زیر انجام شد: صفر= گیاه سالم و بدون علائم بیماری، ۱= ظهور لکه‌های قهوه‌ای کوچک در محل طوقه و ساقه گیاه، ۲= ظهور لکه‌های قهوه‌ای به‌صورت حلقه در اطراف طوقه و ساقه و گسترش آن



شکل ۳. *Phytophthora melonis*: A، هیف؛ B و C، اسپورانژ؛ D و E، آسپور

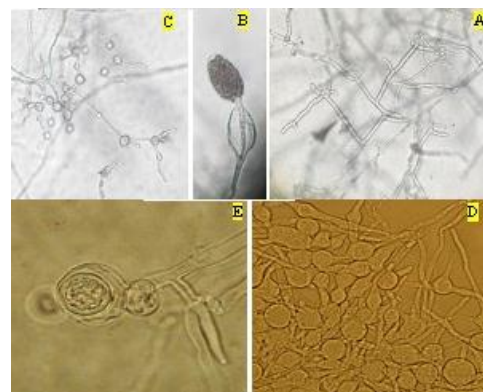
شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه سیر مورد استفاده

تجزیه و تفسیر نتایج حاصل از GC-MS با استفاده از منابع مختلف اجرا شد و اسامی عمومی ترکیبات شناسایی شده که به صورت اسامی آیوپاک در تفسیر اولیه موجود بودند با مراجعه به سایت National Library of Medicine (ChemIdplus Advanced) انجام شد و مقایسه آن با منابع و رفرانس‌های موجود نشان داد که در عصاره سیر، ۲۵ ترکیب شامل Diallyl tetra sulfide (۳۱/۳۲ درصد) و Allyl disulfide (۲۶/۷۸ درصد)، Allyl sulfide (۶/۱۵ درصد)، 1H-1,2,4-Triazole, 3-thiol-5-methyl (۸/۴۰ درصد) و Nitrosothymol (۸/۶۴ درصد) بودند و به عنوان ترکیبات اصلی شناسایی شدند. ترکیبات کلی شناسایی شده عصاره سیر توسط آنالیز گاز کروماتوگرافی همرا با طیف‌سنجی جرمی در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج آنالیز GC-MS اسانس سیر توسط سایر محققان نشان داد که ترکیبات diallyl disulfide، diallyl trisulfide، Trisulfide، di-، diallyl sulfide، allyl methyl trisulfide 2-propenyl بیشترین و اصلی‌ترین ترکیبات اسانس سیر را تشکیل می‌دهند که با نتایج ما متفاوت بود (DimaMnayer et al. 2014, Johnson et al. 2013, Corzomartinez et al. 2007). تفاوت در ترکیبات اسانس سیر توسط محققان مختلف ممکن است ناشی از تغییر در شرایط آب و هوایی، فصل، زمان برداشت، نوع کودهای مصرفی، موقعیت و محل جغرافیایی کشت محصول و غیره باشد (Rahimi-Nasrabadi et al. 2013).

انشعابات آن‌ها حاده و قائمه، عرض هیف‌ها بین ۲-۸ میکرومتر است. اسپورانژها منظم و گلابی یا تخم‌مرغی شکل هستند. اسپورانژیوفرها دارای عرض یکنواخت و کمی باریک‌تر از هیف‌های معمولی هستند و عرض آن‌ها بین ۷-۱ میکرومتر است. دیواره اوسپورها صاف و دارای ضخامت ۱/۵-۳/۸ میکرومتر هستند. کلامیدوسپورها کروی و به صورت منفرد تشکیل می‌شوند (شکل ۲).



شکل ۱. *Phytophthora capsici*: A، هیف و تورم هیفی؛ B، C و D، اسپورانژ؛ E، کلامیدوسپور؛ F، آسپور



شکل ۲. *Phytophthora drechsleri*: A، هیف؛ B، اسپورانژ؛ C و D، تورم و تجمعات هیفی؛ E، آسپور

Phytophthora melonis عامل بوته‌میری کدوبیان، اسپورانژیوم این قارچ بدون پاپیل، غیر ریزان، انتهایی و به شکل گلابی عریض تا کشیده و متوسط به ابعاد ۳۱/۲۴-۱۹/۴۱ میکرومترند. آگونیوم به شکل کروی و با دیواره صاف و به صورت انتهایی تشکیل می‌شوند. آنتریدیوم‌ها آمفی‌ژن هستند. آسپورها کروی، دارای دیواره صاف و بدون تزئینات هستند و تقریباً تمام فضای آگونیوم را پر می‌کنند و متوسط ابعاد آن ۳۳/۱۹ میکرومتر است (شکل ۳).

جدول ۱. ترکیبات شناسایی شده از اسانس سیر به کمک گاز کروماتوگرافی با طیف‌سنجی جرمی (GC-MS)

Number	*RT	Compound	Percentage (%)
۱	۴/۵۵۷	1,2-Dithiolane	۰/۳
۲	۴/۸۶۶	Allyl sulphide	۶/۱۵
۳	۶/۰۷۹	M-Dithiane (Catecholborane)	۲/۱۴
۴	۷/۰۴۶	Semioxamazine (Thiourea, N,N'-dimethyl-)	۰/۸۳
۵	۱۰/۵۸۳	Allyl disulfide	۲۶/۷۸
۶	۱۰/۷۷۷	6-Ethoxy-6-methyl-2-cyclohexenone	۰/۱۴
۷	۱۲/۰۶۵	1,3,5-Trithiane	۲/۹۴
۸	۱۲/۴۵۹	3-Vinyl-1,2-dithiacyclohex-5-ene	۰/۹۱
۹	۱۳/۸۹۶	Diallyl sulfide	۰/۱۶
۱۰	۱۴/۰۹۶	5-Chloro-beznofurazan oxide	۰/۳۱
۱۱	۱۶/۷۷۴	Diallyl tetra sulfide	۳۱/۳۲
۱۲	۱۸/۲۸۴	Thiopropionamide	۲/۳۶
۱۳	۱۸/۶۸۵	Diallyl disulfide	۰/۸۱
۱۴	۲۰/۲۸۱	Allyloxy-butyl dimethylsilane	۰/۵۳
۱۵	۲۲/۸۰۵	1H-1,2,4-Triazole, 3-thiol-5-methyl-	۸/۴۰
۱۶	۲۳/۹۱۵	Arachidonic acid, trimethylsilyl ester	۱/۳۹
۱۷	۲۵/۰۹۴	Silane, butyltrimethoxy-	۲/۰۸
۱۸	۲۵/۴۰۸	Pyridine, 2-(1,2,4-oxadiazol-3-yl)	۰/۴۵
۱۹	۲۵/۷۳۴	1H-Pyrazole, 4-nitro-	۰/۲۵
۲۰	۲۵/۸۴۳	Methyl 4-methoxy-4,8,12,16-tetramethylheptadecanoate	۰/۱۹
۲۱	۲۷/۴۹۷	Benzimidazole, 2-amino-1-methyl-	۰/۷۸
۲۲	۲۸/۰۲۳	Silane, trimethyl(2-phenylethoxy)-	۰/۴۱
۲۳	۲۸/۸۷۰	Nitrosothymol	۸/۶۴
۲۴	۳۰/۴۶۱	2(1H)-Quinolinone, 3-fluoro-4-hydroxy-	۰/۳۲
جمع	-		۹۹/۴۶

*RT: Retention Time

۴ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش غلظت اسانس سیر درصد بازدارندگی آن نیز افزایش پیدا می‌کند. غلظت ۹۵، ۸۷/۵ و ۹۵ پی‌پی‌ام بیشترین تأثیر را روی گونه‌های *P. melonis* و *P. drechsleri*، *P. capsici* دارد و به ترتیب باعث می‌شود که میزان بازدارندگی برگشته قارچ به میزان ۹۰/۵، ۹۰/۵ و ۹۱/۲ درصد کاهش یابد (جدول ۲).

تأثیر اسانس سیر و قارچ‌کش‌ها روی قارچ بیمارگر در شرایط آزمایشگاه
نتایج میزان درصد بازدارندگی اسانس سیر و قارچ‌کش‌های مانکوزب و متالاکسیل - مانکوزب به‌طور جداگانه در ۶ غلظت روی رشد میسیلیوم سه گونه *Phytophthora* *P. melonis* و *P. drechsleri*، *P. capsici* در جدول‌های ۲، ۳ و

جدول ۲. تأثیرات ضد قارچی عصاره سیر روی گونه‌های قارچ فیتوفتورا در شرایط آزمایشگاه

<i>P. capsici</i>		<i>P. drechsleri</i>		<i>P. melonis</i>	
غلظت اسانس سیر (ppm)	درصد بازدارندگی (Inhibition%)	غلظت اسانس سیر (ppm)	درصد بازدارندگی (Inhibition%)	غلظت اسانس سیر (ppm)	درصد بازدارندگی (Inhibition%)
۱۵	۶/۷ ^f	۱۵	۸/۱ ^f	۱۵	۷/۴ ^f
۳۱	۱۲/۳ ^e	۲۹/۵	۱۴/۸ ^e	۳۱	۱۳/۵ ^e
۴۷	۶۲/۳ ^d	۴۴	۴۹/۳ ^d	۴۷	۴۸ ^d
۶۳	۸۱/۷ ^c	۵۸/۵	۶۰/۱ ^c	۶۳	۷۹/۷ ^c
۷۹	۸۴/۴ ^b	۷۳	۷۴/۳ ^b	۷۹	۸۴/۴ ^b
۹۵	۹۰/۵ ^a	۸۷/۵	۹۰/۵ ^a	۹۵	۹۱/۳ ^a

حروف مشابه لاتین نشان‌دهنده نداشتن تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۵ درصد است. تعداد تکرار هر تیمار چهار است.

همچنین، غلظت ۷۲/۵ و ۵۰ پی‌پی‌ام قارچ‌کش مانکوزب و متالاکسیل - مانکوزب به ترتیب باعث می‌شود که میزان بازدارندگی پرگنه هر سه گونه قارچ بیش از ۹۰ درصد کاهش یابد (جدول‌های ۳ و ۴).

جدول ۳. تأثیر قارچ‌کش مانکوزب روی گونه‌های فیتوفتورا در شرایط آزمایشگاه

غلظت اسانس سیر (ppm)	Inhibition (%) درصد بازدارندگی		
	<i>P. capsici</i>	<i>P. drechsleri</i>	<i>P. melonis</i>
۷/۵	۸/۱ ^f	۷/۴ ^f	۶/۷ ^f
۲۰/۵	۲۹ ^e	۱۳/۵ ^e	۳۵/۸ ^e
۳۳/۵	۵۲/۷ ^d	۵۰ ^d	۵۲ ^d
۴۶/۵	۷۵ ^c	۵۹/۴ ^c	۶۷/۵ ^c
۵۹/۵	۸۴/۴ ^b	۷۳/۴ ^b	۸۴/۴ ^b
۷۲/۵	۹۱/۳ ^a	۹۱/۹ ^a	۹۱/۹ ^a

حروف مشابه لاتین نشان‌دهنده نداشتن تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۵ درصد است. تعداد تکرار هر تیمار چهار است.

جدول ۴. تأثیر قارچ‌کش متالاکسیل - مانکوزب روی گونه‌های فیتوفتورا در شرایط آزمایشگاه

غلظت اسانس سیر (ppm)	Inhibition (%) درصد بازدارندگی		
	<i>P. capsici</i>	<i>P. drechsleri</i>	<i>P. melonis</i>
۵	۹/۴ ^f	۷/۴ ^f	۸/۸ ^f
۱۴	۲۵/۷ ^e	۲۸/۴ ^e	۳۶/۵ ^e
۲۳	۵۸/۱ ^d	۵۲/۷ ^d	۵۴ ^d
۳۲	۶۲/۳ ^c	۶۷/۵ ^c	۷۷/۷ ^c
۴۱	۷۴/۳ ^b	۸۵/۲ ^b	۸۵/۸ ^b
۵۰	۹۰/۵ ^a	۹۱/۳ ^a	۹۳/۹ ^a

حروف مشابه لاتین نشان‌دهنده نداشتن تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۵ درصد است. تعداد تکرار هر تیمار چهار است.

قارچ‌کش مانکوزب - متالاکسیل روی گونه‌های فیتوفتورا نشان داد که *P. Capsici* مقاوم‌ترین و *P. melonis* حساس‌ترین قارچ در مقابل قارچ‌کش متالاکسیل - مانکوزب به ترتیب با $EC_{50}=20/869$ و $EC_{50}=17/702$ ppm است (جدول ۵). در مورد قارچ‌کش مانکوزب، قارچ *P. Melonis* حساس‌ترین ($EC_{50}=28/242$ ppm) و *P. Drechsleri* مقاوم‌ترین قارچ ($EC_{50}=34/737$ ppm) بودند (جدول ۵).

مقایسه تأثیر قارچ‌کش‌ها و اسانس سیر روی سه گونه قارچ *Phytophthora*

نتایج حاصل از تأثیر اسانس سیر روی سه گونه قارچ فیتوفتورا و مقایسه آن‌ها با هم نشان داد که *P. Drechsleri* مقاوم‌ترین ($EC_{50}=50/236$ ppm) و *P. capsici* حساس‌ترین ($EC_{50}=46/396$ ppm) قارچ در مقابل ترکیب عصاره سیر در مقایسه با دو گونه دیگر بودند (جدول ۵). نتایج

جدول ۵. EC_{50} اسانس سیر و دو قارچ‌کش مانکوزب و متالاکسیل - مانکوزب روی گونه‌های فیتوفتورا به روش Lethal dose ratio (حد بالا و پایین) در سطح اطمینان ۹۵ درصد

تیمارها	EC_{50} (Median Effective Concentration) ^a		
	<i>P. capsici</i>	<i>P. drechsleri</i>	<i>P. melonis</i>
عصاره سیر	۴۳/۲۹۴ (۳۱/۶۴۶ - ۵۴/۷۱۴)	۵۰/۲۳۶ (۴۰/۸۹۰ - ۶۲/۴۵۸)	۴۵/۳۸۸ (۳۴/۷۶۷ - ۵۶/۲۲۹)
مانکوزب	۲۸/۲۵۲ (۲۵/۴۹۴ - ۳۱/۰۳۴)	۳۴/۷۳۷ (۲۳/۴۹۳ - ۴۸/۳۷۸)	۲۸/۲۴۲ (۲۵/۴۱۶ - ۳۱/۰۹۳)
متالاکسیل - مانکوزب	۲۰/۸۶۹ (۱۵/۵۴۳ - ۲۶/۷۲۲)	۲۰/۰۵۵ (۱۶/۲۴۴ - ۲۳/۹۷۵)	۱۷/۷۰۲ (۱۴/۱۸۰ - ۲۱/۲۱۹)

* غلظتی از قارچ‌کش یا اسانس که از ۵۰ درصد رشد پرگنه قارچ جلوگیری می‌کند.

(Magee 1990). علاوه بر این اسانس سیر فعالیت ضد میکروبی خوبی روی *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Escherichia coli* و *Salmonella typhi* دارد و باعث جلوگیری از رشد آن‌ها می‌شود (Johnson et al. 2013, DimaMnayer et al. 2014).

بررسی تأثیر اسانس سیر و قارچ‌کش‌های شیمیایی روی بیماری بوته‌میری گیاهان در شرایط گلخانه
بررسی تأثیر عصاره سیر و قارچ‌کش‌های متالاکسیل - مانکوزب و مانکوزب در مهار بیماری بوته‌میری حاصل قارچ فیتوفتورا در شرایط گلخانه نشان داد که عصاره سیر در غلظت ۱۰۰ppm باعث کاهش شدت بیماری بوته‌میری فیتوفتورایی روی فلفل، خیار و طالبی به ترتیب به میزان ۷۸/۹، ۷۳/۷ و ۸۱/۵ درصد شد و خاصیت مهارکنندگی آن بیشتر از قارچ‌کش مانکوزب بود (جدول ۶). نتایج این تحقیق نشان داد که قارچ‌کش متالاکسیل مؤثرتر از عصاره سیر است و باعث کاهش شدت بیماری به میزان ۹۲/۱-۸۴/۲ درصد روی سه گونه قارچ بیمارگر شد (جدول ۶).

با توجه به نتایج EC₅₀ به دست آمده برای اسانس سیر و دو قارچ‌کش مورد مطالعه، مشخص شد که خاصیت قارچ‌کشی اسانس سیر تقریباً نزدیک قارچ‌کش مانکوزب است و اسانس سیر فعالیت بازدارندگی خوبی در قیاس با دو قارچ‌کش از خود نشان داد. همچنین، نتایج آزمون قارچ‌کشی و قارچ‌ایستایی نشان داد که اسانس سیر خاصیت قارچ‌ایستایی دارد. اسانس گیاه سیر تأثیر چشمگیری روی قارچ‌های خاکزی مثل *Pythium*، *Phytophthora*، *P. irregulare*، *aphanidermatum* و *cinnomomi* دارد و باعث کاهش رشد پرگنه قارچ روی محیط غذایی CMA شد (Ramseysealy et al. 2007). عصاره سیر مانع فعالیت قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* در آزمایشگاه روی محیط‌های کشت غذایی مصنوعی می‌شود و از رشد پرگنه قارچ جلوگیری و از تشکیل اسپورانژ و جوانه‌زنی زئوسپور قارچ *P. drechsleri* در محیط کشت ممانعت می‌کند (Singh et al. 1979). همچنین، عصاره سیر از جوانه‌زنی میکروکنیدی و هیف‌های قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* عامل پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی ممانعت می‌کند (Tariq and

جدول ۶. تأثیر عصاره سیر و قارچ‌کش‌های شیمیایی روی گونه‌های فیتوفتورا در شرایط گلخانه بعد از ۲۸ روز

تیماها	<i>P. capsici</i>		<i>P. drechsleri</i>		<i>P. melonis</i>	
	Disease severity	Reduction %	Disease severity	Reduction %	Disease severity	Reduction %
<i>A. sativum</i>	۰/۸ ^c	۷۸/۹	۱ ^c	۷۳/۷	۰/۷ ^c	۸۱/۵
Mancozeb	۱/۳ ^b	۶۸/۴	۱/۵ ^b	۶۰/۵	۱/۳ ^b	۶۸/۴
Metalaxyl-Mancozeb	۰/۶ ^d	۸۴/۲	۰/۵ ^d	۸۶/۸	۰/۳ ^d	۹۲/۱
شاهد بیمارگر	۳/۸ ^a	-	۳/۸ ^a	-	۳/۸ ^a	-

حروف مشابه لاتین نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۵ درصد است. تعداد تکرار هر تیمار چهار است.

جوانه‌زنی اسپورانژ و رشد هیف رویشی قارچ *P. infestans* تحت تأثیر اسانس سیر در شرایط آزمایشگاه و مزرعه کاهش یافت و کاربرد اسانس سیر در گیاه گوجه‌فرنگی باعث کاهش شدت بیماری در گیاهان گوجه‌فرنگی نسبت به شاهد شد (Daniela Portz et al. 2008).

نتایج کلی این تحقیق نشان می‌دهد که توانایی و اثربخشی اسانس گیاه سیر به‌عنوان قارچ‌کش تدخینی برای کنترل بیماری‌های بوته‌میری خاکزاد ناشی از قارچ فیتوفتورا بسیار زیاد است و می‌تواند کارایی مایه تلقیح

عصاره گیاه سیر روی بسیاری از عوامل بیماری‌زای قارچی خاکزاد خاصیت سمی دارد و مانع رشد آن‌ها می‌شود. تلقیح بذور لوبیا با عصاره سیر سبب کاهش شدت بیماری پوسیدگی ریشه لوبیا ناشی از *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* می‌شود (Russell and Mussa 1977). همچنین، کاربرد عصاره سیر روی بذر نخود ایرانی باعث کاهش رشد قارچ‌های *F. oxysporum* f. sp. *cicerci* و *S. sclerotiorum* شد و شدت بیماری را به میزان زیادی کاهش داد (Singh et al. 1979).

قارچ‌های بیمارگر را در گلخانه و مزرعه در داخل خاک کاهش دهد و در فرآیند کشاورزی ارگانیک موجب حفاظت از گیاهان در مقابل بیماری‌ها و باعث مقاومت گیاهان در مقابل عوامل بیماریزا شود
 Muhammad Azam Khan *et al.* 2011, Mahlo)
et al. 2010

REFERENCES

- Amini M, Safaie N, Salmani MJ, Shams-Bakhsh, M** (2012) Antifungal activity of three medicinal plant essential oils against some phytopathogenic fungi. Anniversary Edition Trakia Journal of Science 10 (1): 1-8.
- Amvam zollo PH, Biyti L, Tchoumboungang F, Menut C, Lamaty G, Bouchet P** (1998) Aromatic plants of tropical central Africa. Part XXXII. Chemical composition and antifungal activity of thirteen essential oils from aromatic plants of Cameroon. Flavour Fragrance Journal 13: 107-114.
- Bajpai VK, Kang SC** (2012) *In vitro* and *In vivo* inhibition of plant pathogenic fungi by essential oil and extracts of *Magnolia liliflora* Desr. Journal of Agriculture Science Technology 14: 845-856.
- Bajpai VK, Lee TJ, Kang SC** (2008) Chemical composition and *in vitro* control of agricultural plant pathogens by the essential oil and various extract of *Nandina domestica* Thunb. Journal of Science of Food and Agriculture 89: 109-116.
- Belew MA, Olatunde OA, Giwa TA** (2009) Underutilized medicinal plants and spices: chemical composition and phytochemical properties. Journal of Medicinal Plant Research 3(12): 1099-1103.
- Bi Y, Jiang H, Hausbeck MK, Hao JJ** (2012) Inhibitory effect of essential oils for controlling *Phytophthora capsici*. Plant Disease 96: 797-803.
- Corzomartinez M, Corzo N, Villamiel M** (2007) Biological properties of onions and garlic. Trends in food science & technology 18: 609-625.
- Cowan MM** (1999) Plant products antimicrobial agents. Clinical Microbiology Review 12: 564-582.
- Daniela Portz, Eckhard Koch, Alan J Slusarenko** (2008) Effect of garlic (*Allium sativum*) juice containing allivin on *Phytophthora infestans* and downy mildew of cucumber caused by *Pseudoperonospora cubensis*. European Journal of Plant Pathology 122: 197-206.
- Dimamnayer, Anne-Sylvie Fabiano-Tixier, Emmanuel Petitcolas** (2014) Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of six essential oils from the *Allium* family. Molecules 19: 20034-20053.
- D'Mello JPF, Macdonald AMC, Postel D, Dijksma WTP, Dujardin A, Placinta CM** (1998) Pesticide use and mycotoxin production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens. European Journal of Plant Pathology 104: 741-751.
- Ershad J** (1992) *Phytophthora* species in Iran. Agricultural research organization, Tehran, Iran, 217p.
- Etebarian HR** (2012) Diseases of vegetable and cucurbit and their control. Published by University of Tehran, 600 pp.
- Feen ME, Coffey MD** (1984) Studies on the *in vitro* and *in vivo* antifungal activity of Fosetyl-Al and Phosphorous acid. Phytopathology 74: 606-611.
- Johnson OO, Ayoola GA, Adenipekun T** (2013) Antimicrobial activity and the chemical composition of the volatile oil blend from *Allium sativum* (Garlic Clove) and *Citrus reticulata* (Tangeeine Fruit). International Journal of Pharmaceutical Science and Drug Research 5(4): 187-193.
- Khan MA, Zhihui C, Xuemi X, Khan AR Ahmed SS** (2011) Ultrastructural studies of inhibition effect against *Phytophthora capsici* of root exudates collected from two garlic cultivars along with their qualitative analysis. Crop Protection 30: 1149-1155.
- Mahlo SM, McGaw LJ, Eloff JN** (2010) Antifungal activity of leaf extracts from South African trees against plant pathogens. Crop Protection 29: 1529-1533.
- Martinez MC, Crozo N, Vilamiel M** (2007). Biological properties of onion and garlic. Trend in Food-Science and Technol 18: 609-625.
- Muhammad Azam Khan, Cheng Zhihui, Xiao Xuemei** (2011) Ultrastructural studies of the inhibition effect against *Phytophthora capsici* of root exudates collected from two garlic cultivars along with their qualitative analysis. Crop Protection 30: 1149-1155.
- Oxenham SK, Svoboda KP, Walters DR** (2005) Antifungal activity of the essential oil of basil (*Ocimum basilicum*). Journal of Phytopathology 153: 174-180.
- Rahimi-Nasrabadi, Nazarian SH, Farahani H, Fallah-Koohbijari GR, Ahmadi F, Batooli H** (2013) Chemical composition, antioxidant, and antibacterial activities of the essential oil methanol extracts of *Eucalyptus largiflorens*. Int Journal Food Proper 16(2): 369-381.
- Ramsey sealy, Michael R Evans, Craig Rothrock** (2007) The effect of a garlic extract and root substrate on soilborne fungal pathogens. Hort Technology 17(2): 168-173.

- Rasooli I, Moosavi ML, Reazee MB, Jaimand K** (2002) Susceptibility of microorganisms to *Myrtus communis* L. essential oil and its chemical composition. *Agriculture Science Technology* 4: 127-133.
- Russel PE, Mussa AEA** (1977) The use of garlic (*Allium sativum*) extract to control root rot of *Phaseolus vulgaris* caused by *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*. *Annals of Applied Biology* 86: 369-372.
- Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radica M** (2005) Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in food. *Food Chemistry* 91: 621-632.
- Sarpeleh A, Sharifi K, Sonbolkar A** (2009) Evidence of antifungal activity of wild rue (*Peganum harmala* L.) on phytopathogenic fungi. *Journal of Plant Diseases and Protection* 116(5): 208-213.
- Serra R, Lourenco A, Alipio P, Venancio A** (2006) Influence of the region of origin on the mycobiota of grapes with emphasis on *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Mycological Research* 110: 550-553.
- Shouan Zhang, Thomas L White, Miriam C Martinez, John Aclnroy, Joseph W Kloepper, Waldemar Klassen.** (2010) Evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria for control of *Phytophthora* blight on squash under greenhouse conditions. *Biological Control* 53: 129- 135.
- Singh UP, Chauhan VB, Waqner KG, Kumar A** (1992) Effect of ajoene, a compound derived from garlic (*Allium sativum*), on *Phytophthora drechsleri* f. sp. *cajani*. *Mycologia* 84: 105-108.
- Singh UP, Pathak KK, Khare MN, Singh RB** (1979) Effect of leaf extract of garlic on *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*, *Sclerotinia sclerotiorum* and on gram seeds. *Mycologia* 71: 556-564.
- Siripornivoros S, Rngprom W, Sawatdikan S** (2009) Antifungal activity of essential oils derived from some medicinal plant against grey mould (*Botrytis cinerea*). *Asian Journal of Food and Agro-Industry* 229-233.
- Sitara U, Niaz I, Naseem J, Sultana N** (2008) Antifungal effect of essential oil on in vitro growth of pathogenic fungi. *Pakistan Journal of Botany* 40: 409-414.
- Sokovic M, Griensven LJLD** (2006) Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of cultivated button mushroom *Agaricus bisporus*. *European Journal of Plant Pathology* 116: 211-224.
- Soylu EM, Soylo S, Kurt S** (2006) Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia* 161: 119-128.
- Stamps DJ, Waterhouse GM, Newhook FJ, Hall GS** (1990) Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. *Mycol Pap* 162: 28 pp.
- Tariq VN, Magee AC** (1990) Effect of volatiles from garlic bulb extract on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Mycological Research* 94: 617-620.
- Tabarraei M, Amini J, Harighi B** (2011) Effect of fluorescent Pseudomonads for control of damping-off disease of cantaloupe caused by *Phytophthora drechsleri*. *Australian Journal Crop Science* 5(11): 1427-1433.
- Yaouba A, Tatsadjieu NL, Jazet Dongmo PM, Francois Xavier E, Mbofung CM** (2010) Antifungal properties of essential oils and some constituents to reduce foodborne pathogen. *Journal of Yeast and Fungal Research* 1: 1-8.
- Zhang JW, Li SK, Wu WJ** (2009) The main chemical composition and in vitro antifungal activity of the essential oils of *Ocimum basilicum* Linn. var. *pilosum* (Willd.) Benth. *Molecules* 14: 273-278.